

THESIS

MUNICH

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

UNTERSUCHUNGEN ZUR RESORPTION
FREIER FETTSÄUREN

Hans Giselher Pröls

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

UNTERSUCHUNGEN ZUR RESORPTION
FREIER FETTSÄUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Giselher Pröls
aus Monheim

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Priv. Doz. Dr. H. MEHNERT
Korreferent:	Prof. Dr. W. SEITZ
Dekan:	Prof. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 1. 1966

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	5
II. MATERIAL UND METHODE	6
A. Chemische Nachweise	6
B. Versuchsanordnung	8
III. ERGEBNISSE	9
IV. DISKUSSION	26
V. ZUSAMMENFASSUNG	33
VI. LITERATURVERZEICHNIS	34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG

Die Triglyceride sind der wichtigste Bestandteil des Nahrungsfettes. Für die Resorption der Triglyceride ist von Bedeutung, daß sie nach übereinstimmender Ansicht (1, 2, 3) vor der Resorption zum Teil hydrolysiert und somit partiell in Form freier Fettsäuren resorbiert werden.

Das tierische Fett setzt sich überwiegend aus den gesättigten Fettsäuren Stearinsäure und Palmitinsäure sowie aus der ungesättigten Ölsäure zusammen. Besonders im Pflanzenfett kommen aber noch viele andere Fettsäuren mit unterschiedlichem Sättigungsgrad vor. Die langkettigen Fettsäuren sind weder in ihrer freien Form noch als Triglyceride gut wasserlöslich. Bei Resorptionsprüfungen wird deswegen im allgemeinen mit Fettemulsionen oder mit Ölen gearbeitet. Nach einer Berechnung von Wilson (1) werden bei der Fettresorption insgesamt etwa 75 % des verabreichten Fettes in Form freier Fettsäuren aufgenommen. Es liegen keine Angaben darüber vor, in welcher Form diese freien Fettsäuren resorbiert werden, und es ist schwer, den Anteil zu schätzen, der als in Wasser gelöste freie Fettsäuren resorbiert wird.

Aufgabe dieser Arbeit sollte es nun sein festzustellen, in welchem Ausmaß die langkettigen, physikalisch in Wasser gelösten freien Fettsäuren resorbiert werden. Zusätzlich sollte die Prüfung des Phlorizineinflusses Aufschluß über den Resorptionsmechanismus geben. Von Mehnert und Förster (4, 5) war in den letzten Jahren in umfangreichen Untersuchungen die sogenannte "Kollidon-Clearance" als geeignetste Methode zur Resorptionsprüfung am lebenden Tier herausgestellt worden. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit der freien Fettsäuren ist von vornherein die Prüfung der Fettsäureresorption mittels der Schlundsondenmethode ohne Bedeutung, da die Menge der zugeführten Fettsäuren zu gering ist. Zudem ist bei dieser Methode die Magenentleerung der limitierende Faktor für die Resorption rasch resorbierbarer Substanzen. Wesentlich günstiger sind die Verhältnisse bei Perfusion des Dünndarms der Ratte unter Umgehung des Magens. Mit dieser Methode kann infolge großen Volumens der Perfusionslösung auch bei in Wasser schwer löslichen Substanzen ein ausreichendes Darmangebot erzielt werden.

II. MATERIAL UND METHODE

A. CHEMISCHE NACHWEISE

a) Nachweis des Kollidon modifiziert nach Schubert (6)

3 ml wurden vom Perfusat abpipettiert und mit 1 ml 10 %iger Kupfersulfatlösung versetzt. Nach fünfminütigem Erhitzen im siedenden Wasserbad wurde das Kupfersulfat mit 10,61 %iger Kaliumferrocyanidlösung ausgefällt. Danach wurde abgekühlt, gut durchgeschüttelt und zentrifugiert.

Vom Überstand wurden 0,5 ml mit 5 ml Jodjodkalilösung (0,08 mol.KJ : 0,01 mol. Jod-Sublimat) versetzt. Bei Anwesenheit von Kollidon kam es zu einer Farbvertiefung, unter Bildung eines Kollidon-Jod-Komplexes. Dieser Komplex wurde mit 2,5 ml 20 %iger Salzsäure ausgefällt, zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Der Niederschlag war in 25 ml Methylalkohol gut lösbar. Je nach Kollidonkonzentration ergaben sich verschiedene Farbintensitäten, die am Photometer Eppendorf bei 436 mμ abgelesen wurden. Diese Wellenlänge erwies sich, obwohl sie am Rande des bei 358 mμ bestehenden Maximums liegt, als die günstigste, da sie den Vorteil eines größeren Meßbereiches zeigt. Es muß sofort abgelesen werden, da die Farbintensität des Kollidon-Jod-Komplexes bei längerem Stehen abfällt.

Die so erhaltenen Werte wurden mit einer Eichkurve verglichen.

b) Nachweis der zu prüfenden Fettsäuren modifiziert nach Duncombe (7)

1 ml bzw. 5 ml des Perfusats wurden mit aqua destillata auf 100 ml aufgefüllt. Davon wurden 4 ml zusammen mit 4 ml Chloroform in ein Zentrifugenglas gegeben, das mit Schliffstopfen verschlossen werden konnte, und 5 min. mit einer Schüttelmaschine intensiv geschüttelt.

Zur vollständigen Trennung der beiden Phasen wurde 5 min. zentrifugiert, der wässrige Überstand mit einer Blutzuckerpipette, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, abgesaugt. Von der unteren Phase wurden 1, 2 oder 3 ml abpipettiert und in ein sauberes, trockenes Schliffzentrifugenglas gegeben und mit Chloroform auf 5 ml aufgefüllt. Nach Hinzugabe von 2,5 ml Kupfer-Reagenz (9 Teile wässrige m Triäthanolaminlösung, 1 Teil n Essigsäure und 10 Teile 6,45 %ige $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung) wurde wieder intensiv 2 min. geschüttelt. Anschließend wurde die obere Phase nach vorheriger vollständiger Trennung der beiden Phasen verworfen. Von der unteren Phase wurden 3 ml in ein sauberes Röhrchen abpipettiert, wobei darauf geachtet werden mußte, daß keine Spuren der wässrigen Phase mithineingelangten. Dazu wurden 0,5 ml des Diaethyldithiocarbamat-Reagenz gegeben (0,1 %ige Natriumdiaethyldithiocarbamat-Lösung in Butan-2-ol redest.). Bei Anwesenheit eines Kupfer-Fettsäure-Komplexes ergaben sich nach kräftigem Durchmischen je nach Konzentration und Fettsäure verschiedene Farbintensitäten, die am Photometer Eppendorf in einer 2 cm³-Küvette bei 436 m μ abgelesen wurden.

Die so erhaltenen Werte wurden mit Eichkurven verglichen.

c) N a c h w e i s d e r G l u c o s e i m B l u t

Der Nachweis erfolgte nach der von Keilin und Hartee (8) entwickelten Methode in der Anordnung nach Hugget und Nixon (9) (Boeringer-Testverfahren). Dieser Fermentnachweis beruht auf der von der Glucoseoxydase katalysierten Oxydation der Glucose zu Glucuronsäure, wobei Wasserstoffperoxyd entsteht, das in Anwesenheit von Peroxydase o-Dianisidin-Hydrochlorid zu einem rotbraunen Farbstoff oxydiert. Die Konzentration dieses Farbstoffes, der bei 436 m μ im Photometer Eppendorf gemessen wird, erlaubt eine quantitative Bestimmung der Glucose. Zum Test wurden 0,5 ml mit Perchlorsäure enteiweißte Untersuchungsflüssigkeit auf 10 ml Glucosereagenz verwendet.

B. VERSUCHSANORDNUNG

Wir verwendeten zu den Versuchen Albino-Ratten männlichen Geschlechts von 170-240 g Gewicht, die mindestens eine Woche lang mit einer aus Brot, Salatblättern und Fischmehl bestehenden Standardkost gefüttert worden waren. 24 Stunden vor Versuchsbeginn erhielten die Tiere keine Nahrung mehr und wurden in Einzelkäfige gesetzt, deren Bodengitter eine Maschenweite von 1 cm haben, um zu verhindern, daß sie ihren eigenen Kot fressen. Es wurde dadurch ein weitgehend kotfreier Dünndarm zu den Hauptversuchen erhalten.

Die Ratten wurden 1/2 Stunde vor Versuchsbeginn mit 2 ml Urethanlösung betäubt. Das Urethan wurde subcutan injiziert.

Für die Laparatomie wurden die Tiere durch einen leichten Ätherrausch narkotisiert. Das Abdomen wurde mit einem Medianschnitt von etwa 5 cm Länge entlang der Linea alba eröffnet. Eine Knopflochsonde wurde in die pars ascendens des Duodeni eingeführt und mit Zwirn befestigt. Dadurch wurde verhindert, daß größere Mengen von Gallensäuren in den Dünndarm gelangten, die sich störend auf den Fettsäurenachweis auswirken könnten. Im unteren Ileum wurde ein 10 cm langer Kunststoffschlauch von 0,5 cm Durchmesser etwa 5 cm vom Cöcum entfernt in den Darm eingeführt und dort eingebunden. Die Perfusionslösung wurde mit Hilfe eines 1,5 m langen Kunststoffschlauches über die Knopfkanüle in den Darm geleitet. Am unteren Schlauch wurde sie wieder aufgefangen und gemessen. Die so erhaltene Menge des Perfusats gab einen ungefähren Anhalt für die Flüssigkeitsänderung im Darm der Ratte während des Versuchs. Mit Hilfe einer elektrischen Rollenpumpe wurde der Darm zu Versuchsbeginn möglichst schnell gefüllt, dann wurde die Pumpe so eingestellt, daß die Flüssigkeit mit etwa gleichbleibender Geschwindigkeit durch den Darm strömte und so die Konzentration der Lösungen konstant bleiben konnte. Um die Perfusionslösung der Körpertemperatur des Versuchstieres anzupassen, wurde der Kunststoffschlauch durch ein Wasserbad geleitet, das durch einen Thermostaten auf einer Temperatur von 60° gehalten wurde. Auf der kurzen Strecke zwischen Wasserbad und Darm erfolgte durch die Luft eine Abkühlung der Lösung bis etwa auf Körpertemperatur.

Am Ende des Versuchs wurde der Darm mit Luft durchgeblasen, um möglichst die gesamte im Darmlumen zurückgebliebene Flüssigkeit mit zu erfassen.

Es wurde die Resorption von verschiedenen langkettigen Fettsäuren während 60, 90 und 120 min. untersucht. Die Fettsäuren wurden als Natriumsalze verwendet. Dabei wurden 0,025-, 0,05-, 0,1- und 0,5 %ige Lösungen der jeweiligen Substanz verabreicht. Bei 60-minütigen Versuchen wurden 120 ml, bei 90-minütigen 180 ml und bei 120-minütigen 240 ml Perfusionslösung gegeben.

Die Fettsäurelösungen hatten alle einen pH von 7,0 - 8,5, der in diesem Bereich keinen Einfluß auf die Resorption ausübt (10).

Den Versuchslösungen wurden außerdem 0,2 % Kollidon zugesetzt, nachdem sich diese Konzentration bei Vorversuchen als die günstigste erwiesen hatte.

III. E R G E B N I S S E

Die Ergebnisse sind aus folgenden Tabellen und Abbildungen zu ersehen.

Für die Tabellen und die Abbildungen gelten die nachstehenden Abkürzungen.

$\bar{x}$	=	Mittelwert
s	=	Standardabweichung
$s_{\bar{x}}$	=	Streuung
$2s_{\bar{x}}$	=	Signifikanz
n	=	Anzahl der bei den einzelnen Versuchsreihen verwendeten Ratten

T A B E L L E I

Übersichtstabelle über die Zahl der bei den Resorptionsprüfungen verwendeten Ratten (Erklärung siehe Material und Methodik).

Gesamtzahl der Versuchstiere: 186

		60 min.	90 min.	120 min.
Laurinsäure	0,025 %	12		
Laurinsäure	0,050 %	12		
Laurinsäure	0,100 %	12		
Laurinsäure	0,500 %	12		
Myristinsäure	0,025 %	11		
Myristinsäure	0,050 %	15		
Myristinsäure	0,100 %	12		
Palmitinsäure	0,025 %	16	3	3
Stearinsäure	0,025 %	12		
Oelsäure	0,025 %	6		
Linolsäure	0,025 %	6		
Linolensäure	0,025 %	6		
Erucasäure	0,025 %	6		
Gemisch	0,100 %	6		

Prüfung des Einflusses von Phlorizin:

Laurinsäure	0,050 %	Laurinsäure	0,500 %	Myristinsäure	0,050 %
	6		6		6

Prüfung der Wirkung des osmotischen Druckes:

		0,9 % NaCl-Lösung	4 % Xylit
Laurinsäure	0,025 %	6	6
Palmitinsäure	0,025 %	6	

Außerdem wurden noch 6 Ratten zu Leerversuchen verwendet.

T A B E L L E II

Die Resorption verschiedener Fettsäuren (0,025 %) aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte (Versuchsdauer 60 min., Volumen der Perfusionslösung 120 ml).

	n	Durchschnittliches Gewicht der Ratten in g	Resorption in mg	$s_x(\text{mg})$	$2s_x(\text{mg})$	Resorption in %	$s_x(\%)$	$2s_x(\%)$	Wiedererhaltene Flüssigkeitsmenge in ml
Laurinsäure	12	210	12,87	0,24	0,54	42,90	0,83	1,81	102
Myristinsäure	11	187	13,26	0,71	1,56	44,19	2,36	5,19	104
Palmitinsäure	16	240	18,42	0,50	1,05	61,39	1,65	3,49	99
Stearinsäure	12	232	11,94	0,66	1,43	39,79	2,19	4,77	102
Oelsäure	6	224	11,28	0,54	1,32	37,61	1,81	4,42	98
Linolsäure	6	218	7,06	0,76	1,85	23,54	2,52	6,18	106
Linolensäure	6	182	10,24	1,29	3,13	34,13	4,26	10,74	105
Erucasäure	6	181	5,99	0,67	1,63	19,97	2,22	5,42	99

T A B E L L E III

Die Resorption von Laurinsäure in verschiedener Konzentration aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte (Versuchsdauer 60 min., Volumen der Perfusionslösung 120 ml).

	n	Durchschnittliches Gewicht der Ratten in g	Resorption in mg	$s_{\bar{x}}$ (mg)	$2a_{\bar{x}}$ (mg)	Resorption In %	$s_{\bar{x}}$ (%)	$2s_{\bar{x}}$ (%)	Wiedererhaltene Flüssigkeitsmenge in ml
Laurinsäure 0,025 %	12	210	12,87	0,24	0,54	42,90	0,83	1,81	102
Laurinsäure 0,050 %	12	217	17,63	1,10	2,40	29,38	1,84	4,01	106
Laurinsäure 0,100 %	12	175	10,61	0,62	1,34	8,34	0,52	1,12	104
Laurinsäure 0,500 %	12	200	31,32	8,34	18,18	5,22	1,39	3,03	107

T A B E L L E IV

Die Resorption von Myristinsäure in verschiedener Konzentration aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte (Versuchsdauer 60 min., Volumen der Perfusionslösung 120 ml).

	n	Durchschnittliches Gewicht der Ratten in g	Resorption in mg	$s_{\bar{x}}$ (mg)	$2s_{\bar{x}}$ (mg)	Resorption in %	$s_{\bar{x}}$ (%)	$2s_{\bar{x}}$ (%)	Wiedererhaltene Flüssigkeitsmenge in ml
Myristinsäure 0,025 %	11	187	13,26	0,71	1,56	44,19	2,36	5,19	104
Myristinsäure 0,050 %	15	198	23,01	0,60	1,28	38,35	1,01	2,14	105
Myristinsäure 0,100 %	12	219	38,15	1,80	3,92	31,79	1,50	3,27	102

T A B E L L E V

Die Resorption von Palmitinsäure (0,025 %) aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte bei unterschiedlicher Dauer des Versuches.

Palmitinsäure 0,025 %	n	Durchschnitt- liches Gewicht der Ratten in g	Resorption s_x (mg) in mg	$2s_x$ (mg)	Resorption in %	s_x (%)	$2s_x$ (%)	Wiedererhaltene Flüssigkeits- menge in ml
60 min., 120 ml	16	240	18,42	0,50	1,05	1,65	3,49	99
90 min., 180 ml	3	275	28,07	1,20	62,41	2,84	156	
120 min., 240 ml	3	250	35,65	0,98	59,42	1,63	200	

T A B E L L E VI

Änderung der Laurinsäure- bzw. Myristinsäureresorption in mg und Prozent unter Einfluß von 0,1 % Phlorizin.
Werte in Klammern = Resorption ohne Phlorizineinfluß. (Versuchsdauer 60 min., Volumen der Perfusionslösung 120 ml).

	n	Durchschnitt- liches Gewicht der Ratten in g	Resorption in mg	$s_{\bar{x}}$ (mg)	$2s_{\bar{x}}$ (mg)	Resorption in %	$s_{\bar{x}}$ (%)	$2s_{\bar{x}}$ (%)	Wiedererhaltene Flüssigkeits- menge in ml
Laurinsäure 0,050 %	6 (12)	168 (297)	31,21 (17,63)	1,78 (1,10)	4,36 (2,40)	52,02 (29,38)	2,97 (1,84)	7,27 (4,01)	104 (106)
Laurinsäure 0,500 %	6 (12)	200 (200)	64,62 (31,32)	14,46 (8,34)	35,46 (18,18)	10,77 (5,22)	2,41 (1,39)	5,91 (3,03)	108 (107)
Myristinsäure 0,050 %	6 (15)	170 (198)	26,14 (23,01)	0,98 (0,60)	2,41 (1,28)	43,57 (38,35)	1,63 (1,01)	4,01 (2,14)	105 (102)

T A B E L L E VII

Die Resorption von Laurinsäure (0,025 %) und Palmitinsäure (0,025 %) aus dem Blut isotonischen Lösungen (Versuchsdauer 60 min., Volumen der Perfusionslösung 120 ml).

	n	Durchschnittliches Gewicht der Ratten in g	Resorption in mg	$s_{\bar{x}}$ (mg)	$2s_{\bar{x}}$ (mg)	Resorption in %	$s_{\bar{x}}$ (%)	$2s_{\bar{x}}$ (%)	Wiedererhaltene Flüssigkeitsmenge in ml
Laurinsäure	12	210	12,87	0,24	0,54	42,90	0,63	1,81	102
Laurinsäure in 0,9 % NaCl	6	193	13,19	0,55	1,38	43,95	1,82	4,59	103
Laurinsäure in 4 % Xylit	6	190	13,24	0,90	2,21	44,13	3,01	7,37	109
Palmitinsäure	16	240	18,42	0,50	1,05	61,39	1,65	3,49	99
Palmitinsäure in 0,9 % NaCl	6	239	8,57	1,88	4,59	28,56	6,27	15,31	104

T A B E L L E VIII

Änderung der Blutglucose in mg% nach einer einstündigen Dünndarm-perfusion mit verschiedenen Fettsäurelösungen und -konzentrationen.

		Blutglucose- anstieg in mg%	$s_{\bar{x}}$	$2s_{\bar{x}}$	n
Laurinsäure	0,025 %	97	9,12	19,84	12
Laurinsäure (in 0,9 % NaCl)	0,025 %	78	11,22	27,45	6
Laurinsäure (in 4 % Xylit)	0,025 %	128	12,09	29,38	6
Laurinsäure	0,050 %	20	1,69	3,68	12
Laurinsäure (in 0,1 % Phlorizin)	0,050 %	24	1,13	2,78	6
Laurinsäure	0,100 %	34	1,71	3,71	12
Laurinsäure	0,500 %	28	2,30	5,00	12
Laurinsäure (in 0,1 % Phlorizin)	0,500 %	28	2,57	6,31	6
Myristinsäure	0,025 %	84	5,94	13,08	11
Myristinsäure	0,050 %	63	2,79	5,95	15
Myristinsäure (in 0,1 % Phlorizin)	0,050 %	37	3,83	9,39	6
Myristinsäure	0,100 %	55	5,28	11,51	12
Palmitinsäure	0,025 %	55	7,81	19,13	6
Stearinsäure	0,025 %	63	3,41	7,43	12
Oelsäure	0,025 %	105	8,18	20,03	6
Linolsäure	0,025 %	75	8,56	20,98	6
Linolensäure	0,025 %	28	3,26	7,99	6
Erucasäure	0,025 %	76	11,49	28,15	6
Gemisch*	0,100 %	41	4,90	12,02	6
Leerversuche		87	9,69	23,79	6

* Das Gemisch enthielt zu gleichen Teilen Myristin-, Palmitin-, Stearin- und Oelsäure.

Wasserlöslichkeit verschiedener Fettsäuren (als Natriumsalze).

Fettsäuren	0,025%	0,05%	0,1%	0,5%
Erucasäure	löslich	Ø	Ø	Ø
Linolensäure	löslich	Ø	Ø	Ø
Linolsäure	löslich	Ø	Ø	Ø
Olsäure	löslich	Ø	Ø	Ø
Stearinsäure	löslich	Ø	Ø	Ø
Palmitinsäure	löslich	Ø	Ø	Ø
Myristinsäure	löslich	löslich	löslich	Ø
Laurinsäure	löslich	löslich	löslich	löslich

Abb. I

Die Resorption verschiedener Fettsäuren (0,025%) aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte. (Perfusionslösung: 120 ml; Versuchsdauer: 60 Minuten)

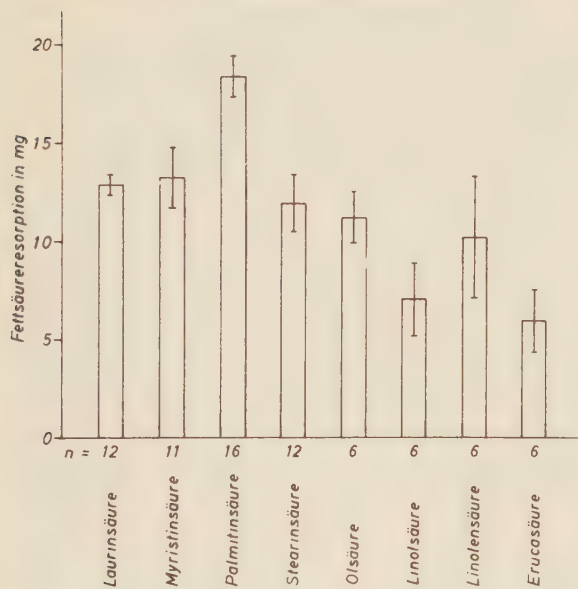


Abb. II

Die Resorption von Laurinsäure in verschiedenen Konzentrationen aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte.

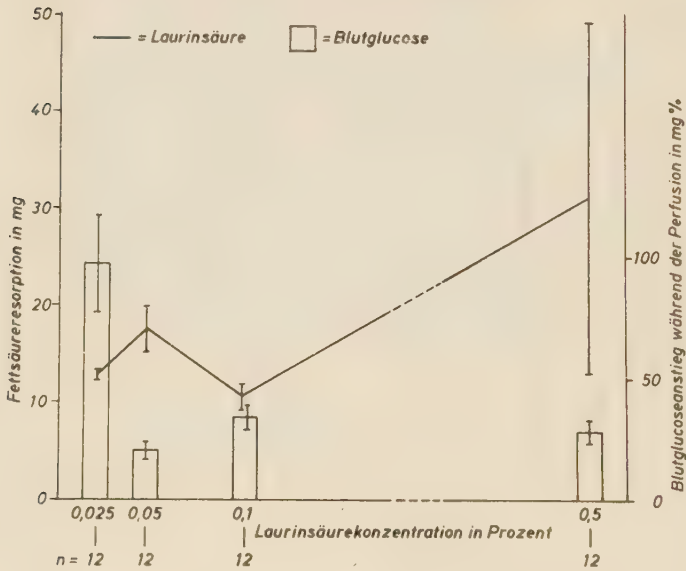


Abb. III

Die Resorption von Myristinsäure in verschiedenen Konzentrationen
aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte.

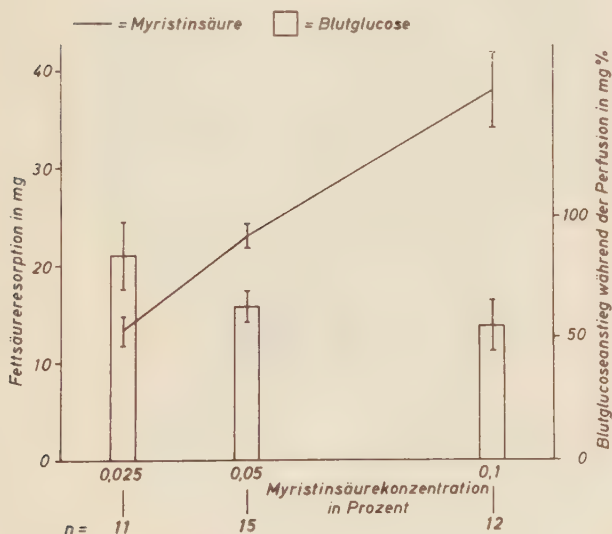


Abb. IV

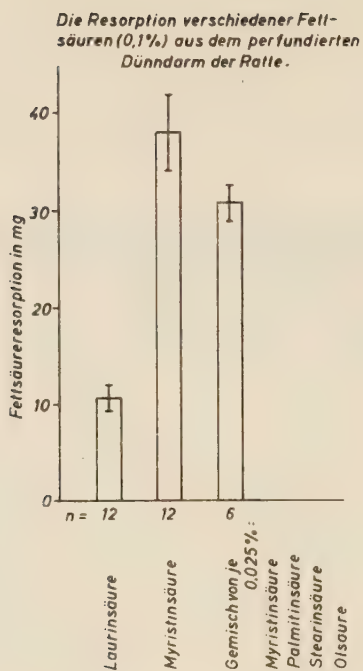


Abb. V

Die Resorption von Laurinsäure (0,025%) und Palmitinsäure (0,025%) in blutisotonischen Lösungen (0,9% NaCl oder 4% Xylit) aus dem perfundierten Dünndarm der Ratte.

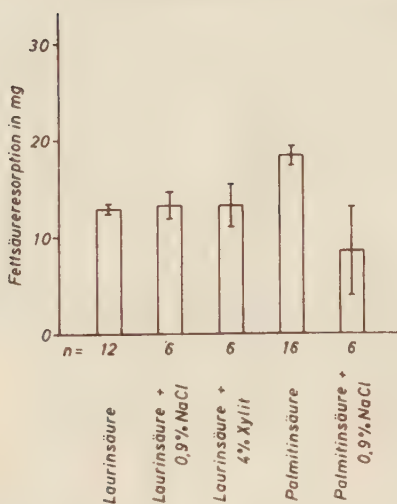


Abb. VI

Einfluss von Phlorizin (0,1%) auf die Resorption von Laurinsäure (0,05% und 0,5%) und von Myristinsäure (0,05%).

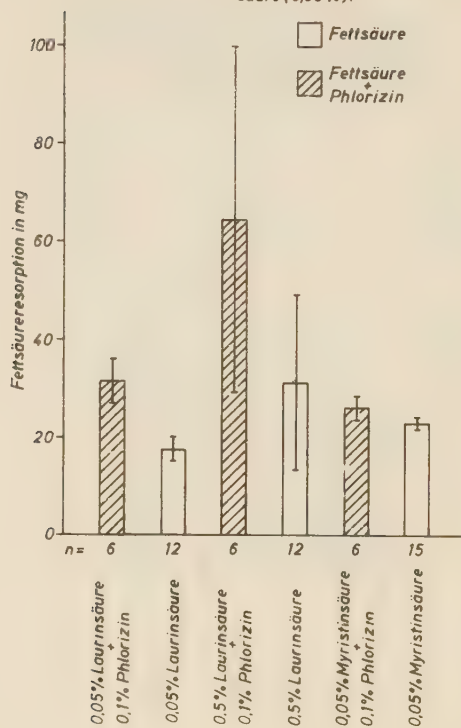


Abb. VII

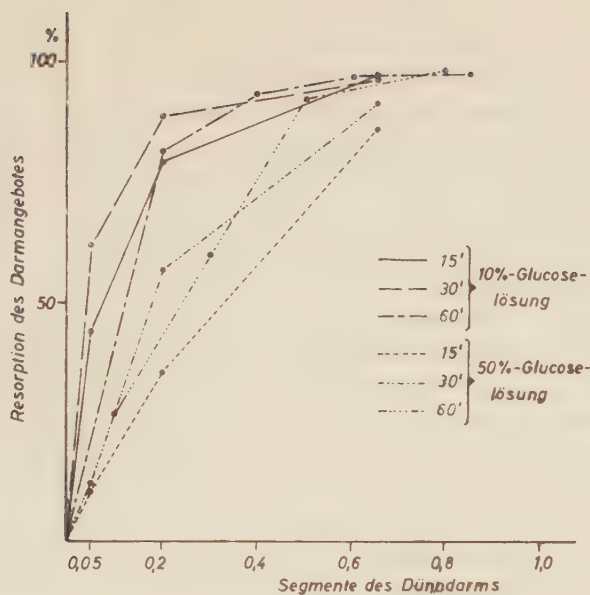


Abb. VIII

Die Abhängigkeit der Resorption 10 %iger und 50 %iger Glucose-lösungen von der Resorptionsdauer und die Lokalisation der Resorption in verschiedenen Segmenten des Dünndarms der Ratte (1,0 = Gesamtlänge des Dünndarms) (nach Förster (19)).

IV. DISKUSSION

Für die Resorption der Fette ergeben sich auch heute noch viele unlöste Probleme. Nachdem um die Jahrhundertwende die Ansicht Pflügers (11, 12), die Resorption erfolge stets erst nach vollständiger Hydrolyse in Form der freien Fettsäuren, bestimmend war, gilt diese Ansicht in einer so strikten Form heute als widerlegt. Für das genaue Verhältnis zwischen resorbierten Triglyceriden, Diglyceriden, Monoglyceriden und freien Fettsäuren werden je nach Arbeitsweise sehr unterschiedliche Ergebnisse angeführt (Lit. siehe bei Wilson (1) und bei Wisemann (2)). Es ist unwahrscheinlich, daß alle Triglyceride gespalten werden - ein Teil der Glyceride wird wahrscheinlich besonders in Form der Monoglyceride direkt durch Pinocytose resorbiert. Aber auch bei partieller Spaltung stellt sich das Problem der Resorption der freien Fettsäuren. Nach Ansicht Wilsons (1) erfolgt die Resorption der Triglyceride zum größten Teil in Form von Monoglyceriden und freien Fettsäuren (siehe Tabelle IX). Die Berechnung von Wilson (1) konnte durch Mattson und Volpenhein (13) neuerdings in etwa bestätigt werden. Auch wenn nach anderen Ergebnissen der Anteil der Fettspaltung von Wilson (1) möglicherweise etwas zu hoch kalkuliert wurde, so muß doch damit gerechnet werden, daß mehr als 50 % der Triglyceride in Form freier Fettsäuren resorbiert werden (Lit. siehe bei Wilson (1) sowie bei Mattson und Volpenhein (13)).

TABELLE IX

Kalkulation der Hydrolyse von Triglyceriden zu freien Fettsäuren während der Dünndarmresorption (nach Wilson (1)).

- | | |
|---------------|--|
| 1. Hypothese: | 25 % der Triglyceride vollständig hydrolysiert
(Schätzung nach vorhandenen Unterlagen)
Triglycerid $\longrightarrow$ freie Fettsäuren + Glycerin |
| 2. Hypothese: | Restliche Triglyceride vollständig zu Monoglyceriden hydrolysiert
(keine quantitativen Angaben verfügbar) |

Schlußfolgerungen: Insgesamt werden demnach 75 % der in den Triglyceriden vorhandenen Fettsäuren abgespalten (nach Annahme 1 und 2).

Für die Resorption der in echter Lösung in Wasser befindlichen Fettsäuren wäre es denkbar, daß bei niedriger Konzentration der freien Fettsäuren die Aufnahme aus dem Darm sehr rasch erfolgt. Ein Faktor, der berücksichtigt werden muß, ist aber die Verringerung der Wasserlöslichkeit mit zunehmender Kettenlänge bzw. die sehr geringe Wasserlöslichkeit der höhermolekularen Fettsäuren (Abb. I).

Bei unserer Versuchsanordnung werden die in Wasser gelösten Fettsäuren in niedrigen Konzentrationen sehr schnell resorbiert. So wird die Palmitinsäure, in 0,025 %iger Lösung verabreicht, zu 61 % resorbiert. Das sind jedoch nur 18 mg pro Stunde bei der angewendeten Durchströmungsgeschwindigkeit. Die Zahlen für die anderen Fettsäuren liegen etwas niedriger (Abb. II). Es fällt auf, daß Laurinsäure und Myristinsäure trotz kürzerer Kettenlänge signifikant langsamer resorbiert werden als die physiologisch bedeutsamere Palmitinsäure (Tab. II). Die Resorption der Stearinsäure, der einfach ungesättigten Ölsäure und der dreifach ungesättigten Linolensäure erfolgt fast so schnell wie die Resorption der kurzkettigen Laurinsäure und Myristinsäure. Von den Vertretern der C_{18} -Fettsäuren wird die zweifach ungesättigte Linolsäure signifikant langsamer resorbiert. Es bleibe dahingestellt, ob die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten in der möglichen Anwesenheit von Oxydationsprodukten zu suchen ist. Am langsamsten resorbiert wird die langkettige einfach ungesättigte Erucasäure. Bei Bezugnahme auf das Molekulargewicht ist die Differenz zwischen der Resorptionsgeschwindigkeit der Palmitinsäure und der Laurinsäure wesentlich geringer. Die Resorptionssteigerung ist aber trotzdem noch signifikant. Dagegen werden die Unterschiede zu den langsamer resorbierten langkettigen Fettsäuren noch größer.

Zur Untersuchung der Frage, ob die einzelnen Fettsäuren sich bei der Resorption gegenseitig beeinflussen, wurde ein Gemisch von vier Fettsäuren verwendet. Dieses Gemisch bestand aus je 0,025 % Myristin-

säure, Palmitinsäure, Stearinsäure und Oelsäure. Dadurch ließ sich eine 0,1 %ige Lösung herstellen, die drei Komponenten enthielt, die für sich allein gelöst nur zu 0,025 % löslich waren, während die 4. Komponente, die Myristinsäure, auch in höheren Konzentrationen noch löslich ist. Es stellte sich heraus, daß keine additive Resorption erfolgte. Die Resorption von 31 mg entspricht etwa der Hälfte des bei der Addition errechneten Wertes (Abb. V). Dieses Ergebnis steht in gewissem Gegensatz zu Ergebnissen von Engelmann et al. (14) und auch von anderen Autoren (siehe bei 11). Engelmann et al. (14) fanden, daß gleichzeitige Zufuhr nicht markierter Ölsäure und Linolsäure die Resorption von C_{14} -markierter Stearinsäure im Sinne eines Mitnahmeeffektes steigert. Bei diesen Autoren war die spez. Aktivität der einzelnen Fraktionen nach Verabreichung markierter Stearin- und nicht markierter Öl- bzw. Linolsäure in der Leber, im Gehirn und im restlichen Körper um teilweise mehr als 200 % höher als bei den Tieren, die die markierte Stearinsäure gemeinsam mit nicht markierter Stearinsäure erhielten.

Bei der bis zu einer Konzentration von 0,1 % gut in Wasser löslichen Myristinsäure ist die Resorption zwischen 0,025 % und 0,1 % annähernd linear abhängig von der Konzentration der verabreichten Lösung (Abb. IV). Bei der reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk geht die resultierende Gerade nicht durch den Koordinatenschnittpunkt. Dadurch ist ein Hinweis, jedoch kein Beweis, für die Beteiligung enzymatischer Vorgänge bzw. eines Transportvorganges während der Resorption gegeben (siehe bei Heinz (15)). Bei der Prüfung der Abhängigkeit der Laurinsäureresorption von der Konzentration dieser Fettsäure im Perfusionsmedium ließ sich bei der Resorption der 0,1 %igen Lösung signifikante Hemmung gegenüber der 0,025 %igen und 0,05 %igen Lösung feststellen (Abb. III). Demgegenüber ist die Resorption aus 0,5 %igen Lösungen wieder gesteigert. Die hier im Verhältnis zu den anderen Konzentrationen aufgetretene sehr große Streuung der Untersuchungsergebnisse weist darauf hin, daß die Einzelergebnisse nicht homogen sind. Dies ist möglicherweise auf eine toxische Wirkung der höheren Laurinsäurekonzentrationen zurückzuführen. Von Enser (16) war nämlich festgestellt worden, daß durch eine 10 m-molare Laurinsäurelösung die Sauerstoffaufnahme von inkubierten Darmpräparationen um 75 % gehemmt wird. Eine 0,5 %ige

Laurinsäurelösung ist ungefähr 20 m-molar. Enser (16) fand bereits für eine 6 m-molare Myristinsäurelösung eine starke Hemmung des Darmstoffwechsels.

Es erhebt sich ferner die Frage, in welchem Darmabschnitt die Resorption der Fette erfolgt. Von Borgström und Mitarbeitern (17, 18) war festgestellt worden, daß das Fett beim Menschen vornehmlich im oberen Dünndarm, besonders im Jejunum, resorbiert wird. Die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Autoren ist jedoch gering, da die verwendete Methode große Fehlermöglichkeiten zuläßt. Die Autoren hatten die Prüfsubstanz zusammen mit einer nicht resorbierbaren Kontrollsubstanz peroral verabreicht und mittels einer Sonde Proben aus verschiedenen Darmabschnitten entnommen. Dabei war eine fast vollständige Resorption im Duodenum und obersten Jejunum festgestellt worden. Bei dieser Methode übt die Magenentleerung einen entscheidenden Einfluß auf das Ausmaß der Resorption aus. Wie aus Abb. VIII zu ersehen ist, ist die Resorption von Glucose-Lösungen nach Verabreichung mit der Schlundsonde bereits im oberen Drittel des Darmes abgeschlossen. Die Kapazität der unteren Darmabschnitte wird überhaupt nicht in Anspruch genommen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Borgström et al. (17, 18) wurde neuerdings von Bennett (20) festgestellt, daß bei der Ratte keine Differenzen zwischen dem oberen und dem unteren Dünndarm bestehen. Bei unserer Versuchsanordnung war das obere Duodenum ausgeschaltet, (siehe Methodik). Damit fehlten im Darm die Pankreasfermente und die Galle. Das Fehlen der Pankreasfermente kann für die vorliegende Fragestellung als bedeutungslos angesehen werden. Die Galle ist aber für die Resorption der Fettsäuren insofern von Bedeutung, als sie mit diesen Aggregate bildet und emulgierend wirkt. Nach Ausschaltung der Galle erhält man also eine Art "Basisresorption", zu der unter vollständig physiologischen Bedingungen noch die Resorption hinsukommt, die nach Aggregatbildung mit den Gallensäuren erfolgt. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, daß bei der Triglyceridresorption die durch Spaltung entstehenden freien Fettsäuren auch Komplexe mit Mono- und Diglyceriden bilden können.

Auch bei neueren Untersuchungen von Pessoa et al. (21) zeigte sich, daß normale Hunde Fett und Fettsäuren zwar besser resorbieren als Hunde mit

Gallenfisteln, daß aber auch diese Hunde den größten Teil der verabreichten Fette und Fettsäuren zu resorbieren vermögen. Damit steht fest, daß die Galle nicht essentiell für die Fettresorption ist. Von Wells et al. (22) und von Baylin et al. (23) wurde außerdem mit Hilfe radioaktiv markierter Fette festgestellt, daß die Anwesenheit von Galle wenig oder keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit des Auftretens markierter Fette im peripheren Blut hatte. Auch an Hunden mit Thiry-Vella-Fisteln (24) erfolgte die Fettresorption in Abwesenheit von Galle.

Unter physiologischen Verhältnissen ist bei Resorptionsvorgängen im Darm mit einem osmotischen Druck zu rechnen, der etwa dem des Blutes gleichkommt. Von Förster und Mehnert (25) war festgestellt worden, daß Erhöhung des osmotischen Druckes im Darmlumen eine Steigerung der aktiven Resorption der Glucose bewirkt. Wir prüften deshalb den Einfluß des osmotischen Druckes am Modell der Laurinsäure unter gleichzeitiger Verabreichung von 0,9 % Kochsalz oder 4 % Xylit, also dem Blut isotonischen Lösungen (Tab. VII). Es ließ sich jedoch keine Steigerung in der Resorption feststellen. Dagegen kam es bei gleichzeitiger Gabe von 0,9 %iger Kochsalzlösung und Palmitinsäure zu einem Abfall der Resorption, der auf das Aussalzen der Palmitinsäure zurückzuführen war (Abb. VI). Es ist daher wahrscheinlich, daß die Pinocytose bzw. die Resorption in micellärer Form den Vorrang vor der Resorption der in Wasser in echter Lösung befindlichen Fettsäuren hat.

Die freien Fettsäuren sind gut löslich in der Zellmembran (26, 27). Es wird angenommen, daß diese Tatsache einen starken Einfluß auf die Resorption ausübt (26, 27). Der limitierende Faktor für die Fettsäureresorption könnte in der Zellmembran zu suchen sein. Er kann aber auch in mangelndem Abtransport aus der Zelle bestehen. Nach Mattson und Volpenhein (13) werden die resorbierten freien Fettsäuren, Monoglyceride und Diglyceride im Darmepithel wieder zu Triglyceriden synthetisiert. Glucoseverabreichung soll diesen Vorgang beschleunigen, da dann sowohl das dazu erforderliche ATP als auch Glycerophosphat gebildet wird. Die Darmepithelzellen sind nicht in der Lage, freies Glycerin für die Synthese der Glyceride zu verwenden. Bei unseren Versuchen war keine Glucose mit verabreicht worden. Zur Triglyceridsynthese hätte also die

Glucose aus dem Blut herangezogen werden müssen. Da die resorbierten Fettsäuremengen nur sehr klein sind, wäre nur sehr wenig Glucose hierfür erforderlich gewesen. Es ist also nicht anzunehmen, daß Glucosemangel die Ursache für die geringe Resorption darstellt.

Wir konnten beobachten, daß der Blutzuckeranstieg während der Perfusion umso geringer war, je höher die Konzentration der Fettsäuren im Perfusat, also auch die Resorption, war (Tab. VIII). Der allgemeine Blutzuckeranstieg war bedingt durch einen sog. "Fesselungsdiabetes", der auftritt, wenn Tiere narkotisiert, festgebunden und zu irgendwelchen Experimenten verwendet werden. Bei Leerversuchen, d.h. bei Versuchen, bei denen nur aqua dest. ohne Zusatz von Fettsäuren perfundiert wurde, konnten wir feststellen, daß der Blutzuckeranstieg etwa der gleiche war wie bei Perfusion einer 0,025 %igen Fettsäurelösung (Tab. VII). Dieser Blutzuckeranstieg ist wahrscheinlich die Folge einer Adrenalinausschüttung oder ähnlicher Mechanismen. Der verminderte Blutzuckeranstieg bei Perfusion mit höher konzentrierten Fettsäurelösungen kann nur zu einem Teil durch den gesteigerten Glucoseverbrauch in der Mukosa für die Synthese von Triglyceriden verursacht sein. Von Engelmann und Mitarbeitern (14) wird beschrieben, daß gleichzeitige Glucoseverabreichung die Resorption von Stearinsäure beschleunigt. Diese Autoren hatten jedoch die Fettsäure in Triglyceriden gelöst, so daß ein direkter Vergleich mit unseren Ergebnissen nicht möglich ist. Sie nehmen an, daß bei Glucoseangebot ATP und Glycerophosphat für die Veresterung zur Verfügung gestellt werden. Andererseits kommt es bei hohem Kohlehydratangebot und auch bei hohem Blutzuckerspiegel zur Hemmung der Fettsäureresorption (26, 27).

Von Nakazawa (28) war 1926 eine Steigerung der Fettresorption durch Phlorizin beschrieben worden. Demgegenüber hatte erst vor kurzem Nissim (29) festgestellt, daß Phlorizin eine Hemmung der Buttersäureresorption verursacht. Während Nakazawa (28) die orale Verabreichung der Substanzen wählte, hatte Nissim (29) seine Versuche an Mäusen mit einer Perfusionsmethode durchgeführt, die einen gewissen Vergleich mit unserer Methode erlaubt. Bei unserer Versuchsanordnung ist in allen drei geprüften Konzentrationen eine signifikante Steigerung der Fett-

säureresorption nachzuweisen. Die Resorptionssteigerung beträgt für 0,05 %ige Laurinsäure etwa 80 % und 0,5 %ige Laurinsäure etwa 100 %. Die Steigerung war für 0,05 %ige Laurinsäure signifikant, während für 0,5 %ige Laurinsäure wegen der hohen Streuung der Einzelwerte nur eine schwache Signifikanz berechnet werden konnte ($p < 0,05$). Die Myristinsäureresorption war durch Phlorizineinfluß zwar nur um etwas mehr als 10 % gesteigert (Abb. VII). Wegen der geringen Streuung der Einzelwerte war aber auch diese Steigerung signifikant (Tab. VI). Phlorizin in der von uns gewählten Konzentration von 0,1 % verursacht eine fast vollständige Hemmung des Stoffwechsels, die an einem verminderten Sauerstoffverbrauch zu messen ist. Eine Begründung für die Steigerung der Fettsäureresorption durch Phlorizin, die wir für Laurinsäure und Myristinsäure nachweisen konnten, kann nicht gegeben werden. Theoretisch wäre eine starke Hemmung der Fettsäureresorption zu erwarten, wenn für die Resorption ein aktiver Transport durch die Zellmembran hindurch stattfinden würde oder zur Beseitigung einer Fettsäure-Anhäufung auf der Innenseite der Zellmembran in den Epithelzellen Glycerophosphat und ATP zur Veresterung der Fettsäuren bereitgestellt werden müßte.

Phlorizin verhindert nicht nur die Bereitstellung von Glycerophosphat und ATP in der verwendeten Konzentration fast vollständig, sondern hemmt auch die aktiven Transportvorgänge. Die Ergebnisse sind jedenfalls nicht vereinbar mit der Annahme, daß für die Resorption der Fettsäuren Stoffwechselleistungen der Epithelzellen in Form einer Bereitstellung energiereicher Verbindungen oder aktiver Zelleistungen (aktiver Transport) erforderlich sind. Es scheint sich demnach auch bei der Resorption von Fettsäuren in erster Linie um Diffusionsvorgänge zu handeln. Es ist in diesem Zusammenhang interessant, daß von Förster und Mehnert (25) in letzter Zeit auch die Bedeutung der sog. aktiven Resorption von Glucose im Darm in Frage gestellt worden war.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe einer Perfusionsmethode wurde an 186 Ratten die Resorption verschiedener Fettsäuren sowie der Einfluß des osmotischen Druckes und des Phlorizins geprüft. Die langkettigen Fettsäuren sind auch als Natriumsalze schwer löslich in Wasser. Die Prüfung der Resorption von physikalisch gelösten Fettsäuren konnte daher bei den meisten Fettsäuren nur in sehr niedrigen Konzentrationen durchgeführt werden. Nur bei Laurinsäure ließ sich eine Lösung bis 0,5 % und bei Myristinsäure bis 0,1 % herstellen. Bei diesen beiden Fettsäuren konnte man eine direkte Abhängigkeit der Resorption von der Konzentration der Perfusionslösung feststellen.

Der Blutzuckeranstieg während der Resorption, eine Folge des Fesselungsdiabetes, ist umso geringer, je höher die Fettsäurekonzentration der verabreichten Lösungen ist. Das ließe sich durch den Glucoseverbrauch im Darmepithel erklären, da zu der dort erfolgenden Triglyceridsynthese Glycerophosphat und ATP erforderlich sind. Gegen diese Annahme spricht, daß Phlorizin zwar mit Sicherheit zu einer Hemmung dieser Stoffwechselvorgänge, jedoch gleichzeitig zu einer ausgeprägten Steigerung der Laurinsäureresorption führt. Auch Myristinsäureresorption wird durch Phlorizin signifikant gesteigert.

Die vorliegenden Ergebnisse werden mit dem Schrifttum verglichen.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Wilson, T. H.: Intestinal Absorption, Saunders Company, Philadelphia, London 1962
2. Wiseman, G.: Absorption from the Intestine, Academic Press, London and New York 1964
3. Clement, G.: La Digestion et L'Absorption des Graisses. Etat Aktuel de Physiologie, Dijon 1965
4. Mehnert, H
u. Förster, H.: Die Prüfung der Resorption von Glucose, Fructose und Sorbit mit einer neuen Methodik, Klin. Wschr. 39, 596 (1960)
5. Förster, H
u. Mehnert, H.: Resorptions- und Sekretionsprüfungen bei Perfusion des Rattendarms mit hypo- und hypertonen Glucoselösungen, Klin. Wschr. 41, 1167 (1963)
6. Schubert, R.
u. Wagner, H.: Normalausscheidung von Periston N bei Anwendung eines neuen Kollidonnachweises. Z. ges. exp. Med. 131, 90 (1959)
7. Duncombe, W. G.: The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids, Biochem. J. 88, 7 (1963)
8. Keilin, D.
and Hartee, E. F.: Properties of catalase. Catalysis of completed oxidation of alcohols, Biochem. J. 39, 293 (1945)
9. Hugget, A.
and Nixon, D. A.: Enzymic determination of blood-glucose. Biochem. J. 66, 12 (1957)
10. Erdlenbruch, W.: Inauguraldissertation (in Vorbereitung)
11. Pflüger, E.: Über die Resorption künstlich gefärbter Fette. Arch. ges. Physiol., 81, 375, 1900
12. Pflüger, E.: Der gegenwärtige Zustand der Lehre von der Verdauung und Resorption der Fette und eine Verurteilung der hiermit verknüpften Vivisektionen am Menschen. Arch. ges. Physiol., 82, 303, 1900

13. Mattson F. H.
and Volpenhein R. A.:
The specific distribution of fatty acids
in the glycerides of vegetables fats.
J. Biol. Chem. 236, 1891 (1961)
14. Engelmann, D.
Stork I.
Näher, A.
Eisenbarth, H. D.
Heyse, D.
und Schreier, K.:
Über die Resorption und den Stoffwechsel
einiger C₁₄-markierter freier Fettsäuren
bei jungen Kaninchen.
Clin. Chim. Acta 9, 126 (1964)
15. Heinz, E.:
Physiologie, Biochemie und Energetik des
aktiven Transports. Naunyn-Schmiedebergs
Arch. exp. Path. Pharmacol. 245, 10 (1963)
16. Enser, M.:
Fatty Acids and Intestinal Metabolism.
Biochem. J. 93, 290 (1964)
17. Borgström, B.
Dahlqvist, A.
Lundh, G.
and Sjövall, J.:
Studies of intestinal digestion and ab-
sorption in the human. J. Clin Invest.
36: 1521 (1957)
18. Borgström, B.
Tryding, N.
and Westö, G.:
On the extent of hydrolysis of triglycerid
ester bounds in the lumen of human small
intestine during digestion.
Acta physiol. Scand. 40, 241 (1957)
19. Förster, H.:
Inauguraldissertation, München (1962)
20. Bennett, S.:
Intestinal absorptive capacity and site
of absorption of fat under steady state
conditions in the unanaesthetized rat.
Quart. J. Exp. Physiol. 49 (1964)
21. Pessoa, V. C.:
Kim, K.S.
and Iry, A.C.:
Fat absorption in absence of bile and
pancreatic juice. Amer. J. Physiol. 174,
209 (1953)
22. Wells, M.H.
Shingleton, W. W.
and Sanders, A. D.:
Absorption in dogs following exclusion
of bile and pancreatic juice using I¹³¹
labeled fat. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.
90, 717 (1955)

23. Baylin, G. J.
 Sanders, A. P.
 Isley, I. K.
 Shingleton, W. W.
 Hymans, I. C.
 Johnston, D. H.
 and Ruffin, I. M.:
 I¹³¹ blood levels correlated with gastric
 emptying determined radiographically.
 2. Fat test meal., Proc. Soc. exp. Biol.,
 N.Y. 89, 54 (1955)
24. Singer, L.
 Magsood, M.
 Medlen, A.B.
 and Conar, C. L.:
 Endogenous and biliary excretion of
 calium-45 and strontium-89.
 Arch. Biochem. Biophys. 66, 404
25. Förster H.
 u. Mehnert, H.:
 Prüfung der Glucoseresorption gegen einen
 erhöhten Blutglucosespiegel.
 Klin. Wschr. 43, 839 (1965)
26. Wilbrand, W.:
 Secretion and transport of nonelectro-
 lytes. Symp. Soc. Exp. Biol. VIII,
 Active transport and secretion 136, 1954
27. Hogban, C. A. M.:
 The alimentary tract. Ann. Rev.
 Physiol. 22, 381 (1960)
28. Nakazawa, F.:
 The influence of phlorizin on intestinal
 absorption. Exper. Med. 288 (1922)
29. Nissim, J. A.:
 Mechanism of intestinal absorption.
 Nature, 204, 148 (1964)

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Mehnert danke ich für die Überlassung des
Themas und für sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Außerdem bin ich Herrn Dr. D. Eberhagen und Herrn Dr. H. Förster
zu Dank verpflichtet für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unter-
stützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. W. Seitz danke ich dafür, daß ich in seiner Klinik
arbeiten durfte.

LEBENS LAUF

Ich, Hans Giseler Pröls, wurde am 1.4.1939 als Sohn des Studenten der Pädagogischen Hochschule Johann Pröls und seiner Ehefrau Eugenie, geb. Kraus, in Monheim geboren. Von 1945 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Ehekirchen bei Neuburg/Donau. 1950 trat ich in das Humanistische Gymnasium in Kempten/Allgäu ein. Im Jahre 1954 wechselte ich an das Gymnasium mit Oberrealschule in Neuburg/Donau über, wo ich 1959 die Reifeprüfung ablegte. Im Herbst 1959 immatrikulierte ich mich an der Universität München für das Studium der Medizin. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im Herbst 1960 ab und die ärztliche Vorprüfung im Herbst 1962. Die ärztliche Prüfung bestand ich am 15.12.1965; am 11.1.1966 promovierte ich an der Medizinischen Fakultät der Universität München.

